

Pemanfaatan Plasma Nutfah Mikroba *Bordetella bronchiseptica* sebagai Perangkat Deteksi Antibodi

Siti Chotiah

Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT

Microbe germplasm of *Bordetella bronchiseptica* has been found in pigs in Indonesia and recognized as the causal agent of atrophic rhinitis and pneumonia, and also one of the agents involved in porcine respiratory disease complex. Those microbes have been characterized and conserved *ex situ* at Balitvet Culture Collection. The aim of this research was to find out seroepidemiological of *B. bronchiseptica* infections at four pig herds in two regencies in Central Java, by utilizing the germ plasma as antibody detection kit. The ELISA technique used lypopolysaccharide and sera hypperimmune of *B. bronchiseptica* local isolate as an antigen and positive sera respectively. Referring to cut off level of 0.404, the survey results showed that of 25.4% of 63 pig serum samples examine by ELISA were positively infected by *B. bronchiseptica*; 14.29% and 11, 11% from Karanganyar regencies and Sragen regencies respectively. Base on pig ages it showed that 10.35%, 24%, and 77.8% to be seropositive from less than three-month age group, three-month until five-month age group, and more than five-month age group respectively. Base on pig farm it was showed that 28.60; 30; 13.64; and 40% were seropositive collected from Farm 1, Farm 2, Farm 3 and Farm 4 respectively. The results indicated that *B. bronchiseptica* infection was spread on four pig herds in two regencies in Central Java with the highest seropositive (77,8%) in more than five-month age group.

Key words: Utilization, germplasm, *Bordetella bronchiseptica*, antibody detection, ELISA, seroepidemiology, pig.

ABSTRAK

Plasma nutfah *Bordetella bronchiseptica* telah ditemukan pada babi di Indonesia, selain merupakan agen penyebab *atrophic rhinitis* dan pneumoni juga salah satu agen *porcine respiratory disease complex*. Mikroba tersebut telah dikarakterisasi dan dikonservasi *ex situ* di *Balitvet Culture Collection* (BCC). Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui seroepidemiologi infeksi *B. bronchiseptica* pada empat peternakan babi di dua kabupaten di Jawa Tengah, dengan memanfaatkan plasma nutfah tersebut sebagai bahan baku perangkat deteksi antibodi. Teknik *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) menggunakan lypopolysaccharide dan serum imun dari isolat lokal *B. bronchiseptica* BS(BCC 2455) masing-masing sebagai antigen

dan serum kontrol positif. Mengacu pada nilai *cut off* 0,404, hasil survei menunjukkan bahwa 25,4% dari 63 sampel serum yang diperiksa positif terinfeksi oleh *B. bronchiseptica*, 14,3% di antaranya berasal dari Kabupaten Karanganyar dan 11,1% dari Kabupaten Sragen. Berdasarkan pengelompokan umur diketahui bahwa seropositif sebanyak 10,35; 24; dan 77,8% masing-masing berasal dari kelompok umur di bawah 3 bulan, kelompok umur 3 sampai 5 bulan, dan kelompok umur di atas 5 bulan. Berdasarkan peternak sebaran seropositif sebanyak 28,60; 30; 13,64; dan 40% masing-masing pada peternakan 1, 2, 3, dan 4. Hal ini menunjukkan infeksi *B. bronchiseptica* telah tersebar di empat peternakan babi di dua kabupaten di Jawa Tengah dengan seropositif tertinggi (77,8%) pada kelompok babi umur di atas 5 bulan.

Kata kunci: Pemanfaatan plasma nutfah, *Bordetella bronchiseptica*, ELISA, seroepidemiologi, babi.

PENDAHULUAN

Bordetella bronchiseptica merupakan bakteri patogen yang dapat menginfeksi saluran pernafasan, terutama pada hewan laboratorium, peliharaan, liar, dan dapat ditularkan ke manusia. Kelinci, marmot, tikus, primata, anjing, babi, kucing, kuda, rubah, tupai, binatang serupa kucing, dan hewan liar merupakan sumber penularan penyakit (Pittman 1984). Penularan dari hewan ke hewan dapat terjadi dengan mudah melalui aerosol dari percikan langsung cairan hidung dari hewan pembawa (de Jong 1999). Hal serupa juga dikemukakan oleh Rutter (1985).

Ada dua bentuk infeksi oleh bakteri *B. bronchiseptica* pada babi, yaitu neonatal (*pulmonary bordetellosis*) yang terjadi pada anak babi yang masih menyusu atau baru disapih. Jika penyakit berjalan lebih lanjut pada babi setengah umur dan umur tua disebut bentuk dewasa (*atrophic rhinitis*) (Giles 1992). Pada anjing, bakteri tersebut menyebabkan tracheobronchitis (Keil dan Fenwick 1998), sedangkan pada kucing dapat menyebabkan penyakit pernafasan (McArdle *et al.* 1994) yang bersifat

patogenik terhadap spesies hewan laboratorium lainnya (Goodnow 1980).

Di Indonesia, *B. bronchiseptica* pertama kali diisolasi dan diidentifikasi dari babi dalam masa pertumbuhan yang menderita pneumonia di suatu peternakan di Tangerang (Chotiah dan Sobironingsih 1996). Kemudian, dari anak babi berumur di bawah satu bulan (masih menyusui) yang berasal dari induk penderita gangguan pernafasan di Karanganyar dan Sragen, Jawa Tengah (Chotiah 2004). Isolat-isolat tersebut sudah dikonservasi secara *ex situ* di *Balivet Culture Collection* sebagai plasma nutfah yang siap untuk dimanfaatkan. Pemanfaatan plasma nutfah mikroba patogen tersebut antara lain sebagai bahan baku vaksin, bahan baku perangkat diagnostik, pengujian efektifitas vaksin, dan obat.

Diagnosis serologis untuk mendeteksi antibodi *B. bronchiseptica* dalam serum dengan cara aglutinasi telah banyak dilakukan. Berbagai metode dalam penyiapan antigen, cara kerja, dan interpretasi hasil telah dievaluasi oleh Giles dan Smith (1983). *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sudah mulai dikembangkan untuk mendeteksi antibodi *B. bronchiseptica* pada berbagai hewan termasuk hewan laboratorium (Boot *et al.* 2004, Mikazuki *et al.* 1992). Uji ELISA untuk mendeteksi antibodi *B. bronchiseptica* pada anjing dinilai lebih cepat, sensitif, dan memerlukan lebih sedikit antigen 50-150 kali dibandingkan dengan uji aglutinasi tabung (Dees *et al.* 1982). Menurut Venier *et al.* (1984), ELISA lebih sensitif untuk mendeteksi antibodi *B. bronchiseptica* pada babi dibandingkan dengan uji aglutinasi.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui seroepidemiologi infeksi *B. bronchiseptica* pada empat peternakan babi di dua kabupaten di Jawa Tengah, dengan memanfaatkan plasma nutfah *B. bronchiseptica* sebagai bahan baku perangkat deteksi antibodi menggunakan metode ELISA.

BAHAN DAN METODE

Plasma Nutfah Mikroba *B. bronchiseptica*

Plasma nutfah mikroba *B. bronchiseptica* BS9 (BCC B2455) diperoleh dari hasil isolasi pada anak babi penderita rinitis, berumur kurang dari

satu bulan pada peternakan babi di Kecamatan Masaran, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Karakteristik dari isolat tersebut adalah Gram negatif, bentuk batang, *non motile*, katalase positif, oksidase positif, tidak memfermentasi karbohidrat, mereduksi nitrat, menghidrolisis urea, alkalin dan sitrat positif, dan bersifat toksigenik (Chotiah 2004). Plasma nutfah tersebut dipakai dalam penelitian ini sebagai antigen ELISA dan pembuatan serum kontrol positif.

Pembuatan Antigen *Lipopolysaccharide* (LPS) untuk ELISA

Antigen dibuat menurut prosedur Chalker *et al.* (2003) dan dimodifikasi. Isolat lokal *B. bronchiseptica* ditumbuhkan ke dalam medium agar *Mc. Conkey* (Oxoid, Inggris) dengan tambahan 1% glukosa, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Beberapa koloni murni yang tumbuh, disubkultur di dalam 250 ml medium kaldu *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Inggris) dan diinkubasikan selama satu malam pada suhu 37°C. Panenan kultur disentrifuge dengan kecepatan 10.000 xg, selama 20 menit pada suhu 4°C dan pelet yang diperoleh disuspensi ke dalam 50 ml Tris-NaCl pH 7,5, kemudian dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 10.000 xg, selama 20 menit pada suhu 4°C, bagian yang tidak terlarut dipanen dan diekstraksi dengan mencampurkan ke dalam larutan fenol jenuh (80%) yang telah dipanaskan pada suhu 68°C selama 15 menit dalam volume sama banyak secara agitasi. Bagian yang encer dipisahkan dan didialisis tiga kali dalam air deionisasi dan disimpan dalam 1 ml tabung eppendorf pada suhu -20°C untuk digunakan lebih lanjut.

Persiapan Antigen untuk Produksi Serum Kontrol Positif

Isolat lokal *B. bronchiseptica* ditumbuhkan ke dalam medium agar *Mc. Conkey* dengan tambahan 1% glukosa (Oxoid, Inggris) dan kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Beberapa koloni murni yang tumbuh disubkultur di dalam medium kaldu BHI (Oxoid, Inggris) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam.

Suspensi biakan dalam medium kaldu kemudian diencerkan dalam cairan garam fisiologis sampai mencapai konsentrasi yang sesuai dengan dosis yang akan diberikan.

Persiapan Serum Kontrol Positif dan Negatif

Tiga ekor babi umur kurang lebih 3 bulan diberi tanda/tato, masing-masing berurutan 1, 2, dan 3. Sebelum diinfeksi, semua babi diambil darahnya dan serum yang diperoleh dipakai sebagai serum kontrol negatif. Sebanyak 0,5 ml panen kultur yang telah diencerkan dalam cairan garam fisiologis disemprotkan ke dalam setiap lubang hidung kiri dan kanan babi nomor 2 dan 3 dengan dosis vertingkat, mulai dari hari ke-1 sebanyak 10^8 colony forming unit (CFU) hari ke-4 sebanyak 10^8 CFU, hari ke-7 sebanyak 10^9 CF, hari ke-10 sebanyak 10^9 CFU, hari ke-13 sebanyak 10^{10} CFU. Pengambilan darah selanjutnya dari semua babi (nomor 1, 2, dan 3) dilakukan selang satu minggu dari minggu ke-1 sampai minggu ke-5. Pada minggu ke-8, semua babi diambil darahnya dan serum yang diperoleh masing-masing diberi tanda, lalu disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan lebih lanjut.

Konjugat

Rabit anti Pig IgG yang dilabel dengan *horse raddish peroxydase* (Sigma) digunakan dalam penelitian ini. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan larutan penyangga sodium karbonat pH 9,0.

Substrat

Substrat untuk pereaksi enzim digunakan 1 m M ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline 6 sulphonate) dalam 0,1 M bufer asam sitrat pH 4,2 dengan tambahan 2,5 mM H_2O_2 . Substrat tersebut digunakan dalam penelitian ini.

Prosedur ELISA

Sebelum prosedur ELISA dilakukan, semua reagensia yang akan dipakai distandarisasi dahulu untuk mencapai nilai optimal, dengan titrasi *checker-board* antigen, serum, dan konjugat. Standarisasi antigen dimulai dengan pengenceran 1 : 25-1 : 800, dititrasi dengan serum enceran 1 : 100 dan konjugat

anti babi IgG 1 : 5.000, 1 : 10.000, dan 1 : 20.000. Proses ELISA menggunakan cawan mikro 96 lubang dan tipe dasar cekung (Maxi Sorp NUNC).

Prosedur ELISA mengikuti metode Chalker *et al.* (2003) dan dimodifikasi. Sebanyak 100 μl antigen enceran optimal dalam larutan *coating buffer* Na_2CO_3 (95 mM Na_2CO_3 , 50 mM NaHCO_3 pH 9,0) dimasukkan ke dalam setiap lubang cawan, lalu dieramkan pada suhu 37°C selama 1 jam sambil dikocok perlahan-lahan memakai *shaker*. Antigen yang tersisa dibuang, dan setiap lubang diblock dengan 3% (w/v) *skim milk powder* dalam TNT (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 8,0, 0,1% Tween), dieramkan selama 1 jam pada suhu 37°C sambil dikocok perlahan. Semua lubang cawan dicuci sebanyak tiga kali dengan TNT. Sampel serum enceran optimal dalam larutan 3% milk TNT, sebanyak 100 μl dimasukkan ke dalam lubang cawan (masing-masing sampel dikerjakan duplo), lalu dieramkan selama 1 jam pada suhu 37°C sambil dikocok perlahan. Cawan dicuci lima kali, kemudian ke dalam setiap lubang cawan dimasukkan 100 μl konjugat anti pig IgG peroxidase enceran optimal dalam 3% milk TNT, dieramkan selama 1 jam pada suhu 37°C sambil dikocok perlahan. Setelah dicuci lima kali, ke dalam setiap lubang cawan dimasukkan 100 μl larutan substrat ABTS (Sigma). Satu jam kemudian densitas optikal dibaca menggunakan mesin pembaca ELISA, dengan panjang gelombang 414 nm.

Sampel Serum

Sebanyak 63 sampel serum darah babi terdiri atas 31 sampel berasal dari dua peternakan di Kabupaten Karanganyar dan 32 sampel dari 2 peternakan di Kabupaten Sragen, Jawa Tengah, dengan keterangan tidak pernah dilakukan vaksinasi Bordetellosis.

Analisis Data

Penentuan nilai positif dan negatif dari hasil uji ELISA ditentukan dengan nilai *cut off* menurut FAO/IAEA (1991) dan Sutherland (1984/85) dalam Spencer (1993). Data yang diperoleh dianalisis berdasarkan pengelompokan daerah asal sampel, umur, dan peternakan. Tiga kelompok umur, di bawah 3 bulan (masih menyusui dan lepas sapih), 3 bulan

sampai 5 bulan (masa pertumbuhan dan penggemukan), dan di atas 5 bulan (induk telah melahirkan). Dua kelompok daerah, yaitu kelompok Kabupaten Karanganyar dan Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Empat kelompok peternak yang diambil sampelnya, yaitu peternak 1, 2, 3, dan 4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Serum Kontrol Negatif dan Positif

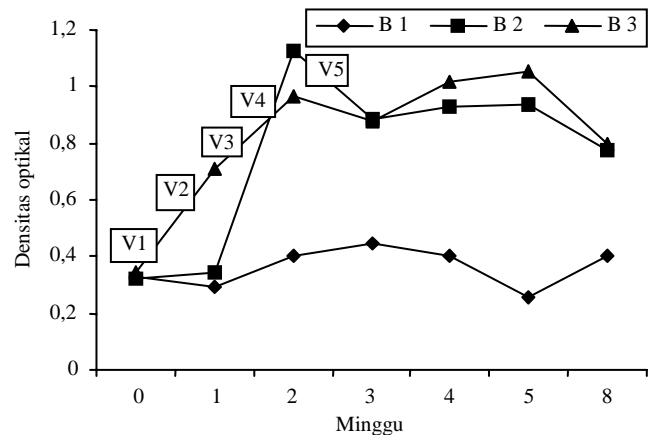
Serum kontrol positif diperoleh dengan melakukan infeksi buatan pada tiga ekor babi. Pantauan antibodi IgG pada babi yang diinfeksi dengan isolat lokal *B. bronchiseptica* BS9 (BCCB2455) untuk pembuatan serum kontrol positif dan negatif dapat dilihat pada Gambar 4. Serum dengan nilai densitas optikal ELISA antibodi IgG *B. bronchiseptica* tinggi dipakai sebagai serum positif. Uji ELISA menggunakan serum kontrol negatif dari serum yang dikoleksi pada 0 minggu dari babi nomor B1 dan serum kontrol positif dipakai dari serum yang dikoleksi pada minggu ke-10 dari babi nomor B3 (Gambar 1).

Standarisasi ELISA

Hasil titrasi standar menunjukkan bahwa antigen pada enceran 1 : 100 memberikan nilai P/N tertinggi, yaitu 4,0 (Gambar 2) dengan nilai densitas optikal serum kontrol positif 1,179 dan serum negatif 0,296. Dari hasil tritasi telah ditentukan pengenceran antigen 1 : 100, serum 1 : 100, dan konjugat antibabi IgG 1 : 5.000.

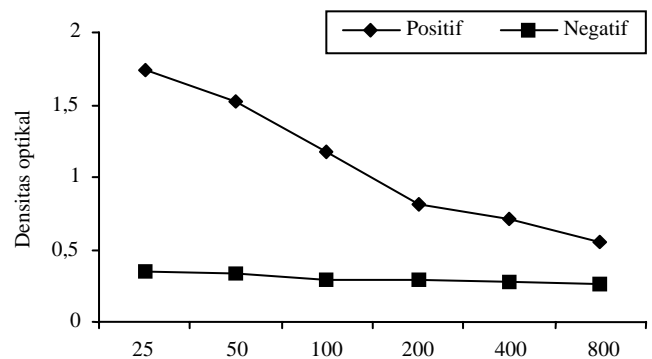
Penentuan Nilai Cut Off

Nilai *cut off* adalah nilai rata-rata densitas optikal serum negatif, ditambah tiga kali standar deviasi ($OD\ S- + 3\ SD$) menurut referensi Spencer (1993). Gambar 3 menunjukkan sebaran nilai densitas optikal dari 30 sampel serum negatif antibodi IgG *B. bronchiseptica* pada babi di peternakan di Jawa Tengah yang dipakai untuk menentukan nilai *cut off*. Nilai rata-rata densitas optikal serum negatif adalah 0,2236 dan standar deviasi 0,060087 sehingga nilai *cut off* adalah 0,403861.

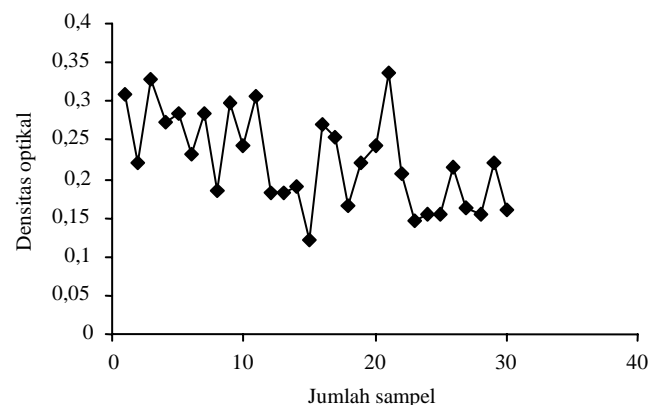


V1-V5 = babi nomor 1 dan 2 diinfeksi *B. bronchiseptica*.

Gambar 1. Pantauan antibodi IgG pada anak babi yang diinfeksi dengan isolat lokal *B. bronchiseptica* BS9 (BCC B2425) untuk pembuatan serum kontrol positif dan negatif.



Gambar 2. Titrasi antigen dengan enceran serum 1 : 100 dan konjugat antibabi IgG 1 : 5.000.



Gambar 3. Sebaran nilai densitas optikal (ELISA) serum negatif antibodi IgG *B. bronchiseptica* pada babi untuk menentukan nilai *cut off*.

Seroepidemiologi Infeksi *B. bronchiseptica*

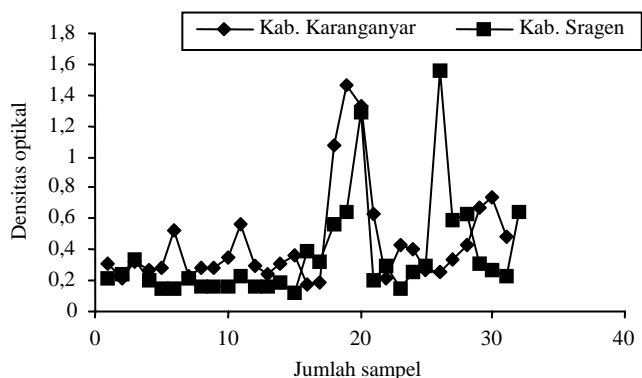
Mengacu pada nilai *cut off* 0,403861, antibodi IgG terhadap antigen LPS *B. bronchiseptica* didektesi menggunakan metode ELISA. Dalam hal ini 16 serum (25,4%) memberikan reaksi positif, satu serum (1,4%) memberikan reaksi dubius, dan 46 serum (73,2%) memberikan reaksi negatif (Tabel 1).

Sebaran nilai densitas optikal (ELISA) antibodi IgG *B. bronchiseptica* berdasarkan lokasi (daerah) pengambilan sampel disajikan pada Gambar 4. Dari 16 sampel serum yang memberikan hasil positif, sembilan sampel di antaranya (14,29%) berasal dari Kabupaten Karanganyar dan selebihnya (11, 11%) dari Kabupaten Sragen.

Seroprevalensi infeksi *B. bronchiseptica* pada peternakan babi sebanyak 28,60; 30; 13,64; dan 40% masing-masing pada peternakan 1, peternakan 2, peternakan 3, dan peternakan 4 dengan sebaran nilai densitas optikal disajikan pada Gambar 5. Peternakan 1 di Kabupaten Karanganyar dan peternakan 3 dan 4 di Kabupaten Sragen pada tahun 2003 telah dinyatakan terinfeksi *B. bronchiseptica* berdasarkan diagnosis gejala klinis dan isolasi agen (Chotiah 2004).

Tabel 1. Sebaran antibodi IgG *B. bronchiseptica* pada serum babi diperiksa dengan metode ELISA.

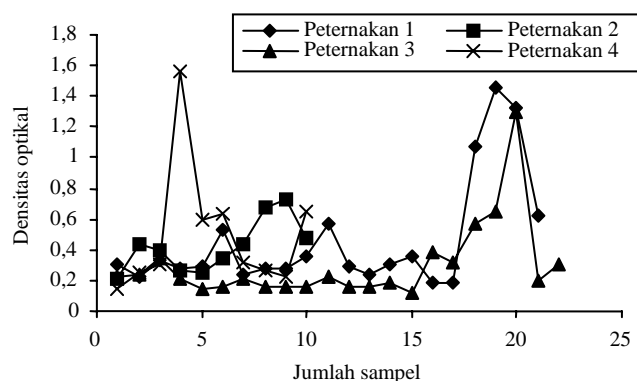
Densitas optikal	Jumlah serum	Persentase	Diagnosis
≤0,404	46	73,2	Negatif
0,414-0, 454	1	1,4	Dubius
>0,454	16	25,4	Positif
Jumlah	63	100	



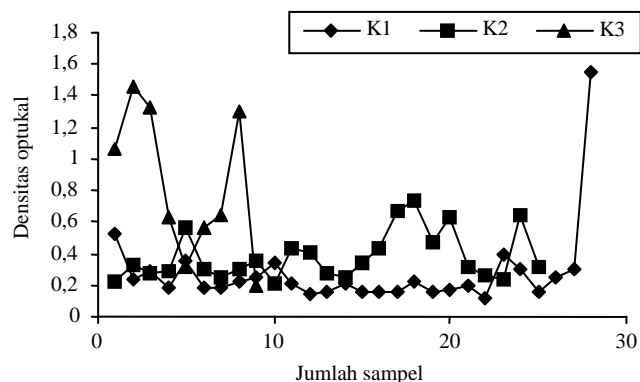
Gambar 4. Sebaran nilai densitas optikal (ELISA) antibodi IgG *B. bronchiseptica* berdasarkan lokasi (daerah) pengambilan sampel.

Sebaran nilai densitas optikal antibodi IgG *B. bronchiseptica* berdasarkan umur babi dilihat pada Gambar 6. Sampel serum yang telah diperiksa, setelah dikelompokkan ke dalam tiga kelompok umur, menunjukkan bahwa seropositif infeksi *B. bronchiseptica* sebanyak tiga sampel (10,35%), enam sampel (24%), dan tujuh sampel (77,8%) masing-masing berasal dari kelompok 1 umur di bawah 3 bulan (masih menyusui dan lepas sapih), kelompok 2 umur 3 bulan hingga 5 bulan (masa pertumbuhan dan penggemukan), dan kelompok 3 umur di atas 5 bulan (induk telah melahirkan).

Penelitian ini memperlihatkan seroprevalensi infeksi *B. bronchiseptica* tertinggi (77,8%) terjadi pada induk babi yang telah melahirkan di Peternakan 1 dan Peternakan 3. Sesuai dengan penelitian



Gambar 5. Sebaran nilai densitas optikal (ELISA) antibodi IgG *B. bronchiseptica* berdasarkan peternakan.



K1 = kelompok umur di bawah 3 bulan (masih menyusui dan lepas sapih), K2 = kelompok umur 3 bulan hingga 5 bulan (masa pertumbuhan dan penggemukan), K3 = kelompok umur di atas 5 bulan (induk telah melahirkan).

Gambar 6. Sebaran nilai densitas optikal (ELISA) antibodi IgG *B. bronchiseptica* berdasarkan umur.

Chotiah (2004) pada tahun 2003, pada peternakan tersebut telah terjadi kasus Bordetellosis pada anak babi yang masih menyusu dan baru lepas sapih. Dari anak babi tersebut telah diisolasi *B. bronchiseptica* yang bersifat toksigenik. Keberadaan antibodi pasif pada anak babi yang berasal dari induk yang telah terinfeksi *B. bronchiseptica* secara alami kelihatannya memberikan proteksi terhadap perkembangan lesi pada *turbinate* (Rutter 1981), tetapi tidak demikian terhadap infeksi ulang (Kobisch dan Pening 1989, Voets 1990). Walaupun demikian vaksinasi pada induk menunda terjadinya infeksi pada anak babi sampai umur 12-16 minggu, sementara infeksi pada kelompok yang tidak divaksin terjadi pada umur 2 minggu (Rutter *et al.* 1984).

KESIMPULAN

Plasma nutfah mikroba *B. bronchiseptica* yang ada dapat dimanfaatkan sebagai antigen dan produksi serum kontrol positif untuk deteksi antibodi dengan metode ELISA. Seropositif infeksi oleh *B. bronchiseptica* telah terjadi pada kelompok babi di dua peternakan di Kabupaten Karanganyar dan dua peternakan di Kabupaten Sragen, Jawa Tengah, dengan prevalensi tertinggi (77,8%) terjadi pada babi umur di atas 5 bulan (induk).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Drh. Tati Ariyanti, MP, peneliti Bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner, Kepala Laboratorium Kesehatan Hewan Wilayah Surakarta, petugas Kesehatan Hewan Kabupaten Karanganyar dan Kabupaten Sragen, atas bantuan teknis dalam pengambilan sampel di lapang. Ucapan yang sama disampaikan kepada sdr. Agus Wahyudin dan Sukatma, teknisi Bakteriologi, yang telah membantu dalam penyiapan bahan dan cara kerja selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

Boot, R., L. Van Den Berg, M.A. Koedam, and J.L. Veenema. 2004. *Bordetella avium* cross-reaction with *B. Bronchiseptica* by ELISA but natural *Borde-*

- tella avium* infection in rats is unlikely. Scan. J. Lab. Anim. Sci. 4(31):209-213.
- Chalker, V.J., C. Toomey, S. Opperman, H.W. Brooks, M.A. Ibuoye, J. Brownlie, and A.N. Rycroft. 2003. Respiratory disease in Kennelled Dog: Serological responses to *B. Bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. Clincal and Diagnostic Laboratory Immunology 10(3):352-356.
- Chotiah, S. dan S. Sobironingsih. 1996. Deteksi bakteri dan mikoplasma patogenik dari paru-paru babi penderita pneumonia dan gambaran perubahan histopatologik. JITV 2(1):50-53.
- Chotiah, S. 2004. Infeksi *Bordetella bronchiseptica* pada anak babi di Jawa Tengah. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Ciawi-Bogor, 26-27 Agustus 2004. hlm. 656-662.
- Dees, C., M.W. Fountain, V.S. Panangala, L.J. Swango, and R.D. Schultz. 1982. An ELISA test do detect antibody to *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Immunopathol. 3(6):539-545.
- De Jong, M.F. 1999. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. Disease of Swine. 8th ed. Iowa State University Press. Aress. Ames. Iowa, USA. p. 355-383.
- Giles, C.J. and I.M. Smith. 1983. Vaccination of pigs with *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Bull. 53:327.
- Giles, C.J. 1992. Bordetellosis. In Leman, A.D., B.E. Straw, W.I. Mangeling, S.D. Allaire, and D.J. Taylor (Eds.). Disease of Swine. Iowa State University Press, Ames. p. 436-445.
- Goodnow, R.A. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev. 44:722-738.
- Keil, D.J. and B. Fenwick. 1998. The role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212:200-207.
- Kobisch, M. and A. Pennings. 1989. An evaluation in pig of Nobis-Vac AR and an experimental atrophic rhinitis vaccine containing *Pasteurella multocida* DNT-toxoid and *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Rec. 124:57-61.
- McArdle, H.C., S. Dawson, A.J. Coutis, M. Bennett, C.A. Hart, R. Ryvar, and R.M. Gaskell. 1994. Seroprevalence and isolation rate of *Bordetella bronchiseptica* in cat in UK. Vet. Rec. 134:506-507.
- Mikazuki, K., T. Hirasawa, Y. Sakai, S. Ohhara, H. Nenui, and K. Takahashi. 1992. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Bordetella bronchiseptica* infection in guinea pigs. Jikken Dobutsu 41(3):357-362.
- Pittman, M. 1984. Genus *Bordetella*. In Krieg, N.R. and J.G. Holt (Eds.). Bergey's Manual of determinatifve Bacteriology Williams and Wilkins. Baltimor and London. p. 388-393.

- Rutter, J.M. 1981. Quantitative observation on *Bordetella bronchiseptica* infection in atrophic rhinitis of pig. Vet. Rec. 108:451-454.
- Rutter, J.M., R.J. Taylor, W.G. Crighton, I.B. Robertson, and A.J. Bentson. 1984. Epidemiological study of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis. Vet. Rec. 115:615-619.
- Rutter, J.M. 1985. Atrophic rhinitis in swine. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 29:239-279.
- Spencer, T. 1993. Standardization of serology. Penyakit Hewan 25(46A):1-6.
- Venier, L., M.F. Rothschild, and C.M. Warner. 1984. Measurement of serum antibody in swine vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*: Comparison of agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay method. Am J Vet Res. 45:2634-2636.
- Voets, M.T. 1990. Evaluation of the challenge model to test AR vaccine. Proc. Int. Congr. Pig. Vet. Soc. p. 11-56.